

**INCORPORACIÓN DE ÓXIDO DE TITANIO PARA LA ESTABILIZACIÓN  
HIDROLITICA DE FASES ENLAZADAS EN ELECTROFORESIS CAPILAR**

**FABIAN HERLEY NAVARRO PEÑA**

**UNIVERSIDAD DEL VALLE  
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES  
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA  
SANTIAGO DE CALI**

**2011**

**INCORPORACIÓN DE ÓXIDO DE TITANIO PARA LA ESTABILIZACIÓN  
HIDROLITICA DE FASES ENLAZADAS EN ELECTROFORESIS CAPILAR**

**FABIAN HERLEY NAVARRO PEÑA**

**Trabajo de grado presentado como requisito parcial para optar el titulo  
de Químico**

**Director: JUNIOR E. SANDOVAL, Ph.D.**

**Co-Director: JOSE H. ESPINAL, M.Sc.**

**UNIVERSIDAD DEL VALLE**

**FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES**

**DEPARTAMENTO DE QUÍMICA**

**SANTIAGO DE CALI**

**2011**

**INCORPORACIÓN DE ÓXIDO DE TITANIO PARA LA ESTABILIZACIÓN  
HIDROLÍTICA DE FASES ENLAZADAS EN ELECTROFORESIS CAPILAR**

**FABIAN HERLEY NAVARRO PEÑA**

**Trabajo de grado presentado como requisito parcial para optar el  
título de Químico**

**Director: JUNIOR E. SANDOVAL, Ph.D.**

**Co-Director: JOSE H. ESPINAL, M.S.**

**TEMAS:**

- **Electroforesis capilar**
- **Fases enlazadas**
- **Estabilidad hidrolítica**



UNIVERSIDAD DEL VALLE  
FACULTAD DE CIENCIAS  
ACTA DE EVALUACION DE TRABAJO DE GRADO  
PROGRAMA ACADEMICO DE QUIMICA.

JURADO CONFORMADO POR:

1. DR. JUNIOR E. SANDOVAL
2. DR. HUMBERTO ESPINAL
3. DR. WALTER TORRES

El día 3 de Marzo de 2011 a las 2:30 P.M se llevó a cabo la ENTREGA DE LA EVALUACION ( ) SUSTENTACION ( X ) del INFORME FINAL DEL TRABAJO DE GRADO titulado **"INCORPORACION DE ÓXIDO DE TITANIO PARA LA ESTABILIZACIÓN HIDROLITICA DE FASES ENLAZADAS EN ELECTROFORESIS CAPILAR"**. Presentado por el estudiante FABIAN NAVARRO PEÑA con código 0625268, bajo la dirección del Dr. JUNIOR E. SANDOVAL.

Candidato a Grado para la ceremonia de:

RESULTADO DE LA EVALUACION:

- ☒ ) APROBADO.  
( ) RECOMENDACIÓN DE DISTINCION DE MERITORIO.  
( ) RECOMENDACIÓN DE DISTINCION DE LAUREADO.  
( ) REPROBADO.

Se recomienda modificaciones: SI ( ) NO ☒.

OBSERVACIONES

JUNIOR E. SANDOVAL  
DIRECTOR DEL TRABAJO

HUMBERTO ESPINAL  
CODIRECTOR

WALTER TORRES  
JURADO

LUZ MARINA JARAMILLO  
DIRECTORA DEL PROGRAMA

**A DIOS Y A MIS PADRES**

## **AGRADECIMIENTOS**

El autor manifiesta sus agradecimientos a:

Dios por su dirección y sabiduría en la formación espiritual y académica.

Mis padres, Tirso Navarro y Marleny Peña por su apoyo moral y financiero durante toda mi formación en pregrado.

El profesor Junior Sandoval, director del trabajo de grado, y su grupo de investigación conformado por el profesor José Humberto Espinal y Jorge Gómez, por la oportunidad brindada y sus importantes orientaciones.

La Universidad del Valle, por sus recursos y espacio.

Todas las personas que hicieron posible la culminación de este trabajo.

## TABLA DE CONTENIDO

<b>RESUMEN.....</b>	<b>1</b>
<b>0. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>2</b>
<b>1. OBJETIVOS.....</b>	<b>3</b>
<b>2. MARCO TEÓRICO Y ANTECEDENTES.....</b>	<b>4</b>
2.1. HPCE: PODEROSA HERRAMIENTA ANALÍTICA.....	4
2.2. ELECTROFORESIS CAPILAR DE ALTO DESEMPEÑO.....	5
2.3. FASES ENLAZADAS.....	7
2.4. INCORPORACIÓN DE TITANIO EN SÍLICA.....	9
2.5. POLIMERIZACIÓN.....	11
<b>3. PARTE EXPERIMENTAL.....</b>	<b>12</b>
3.1. EQUIPOS .....	12
3.2. MATERIALES.....	13
3.3. REACTIVOS.....	14
3.4. PROCEDIMIENTOS.....	14
3.4.1. Secado de solventes.....	14
3.4.2. Preparación de soluciones.....	15
3.4.3. Pretratamiento de <i>wafers</i> y columnas capilares.....	16
3.4.4. Titanización.....	17
3.4.4.1. Titanización en condiciones anhidras.....	17
3.4.4.2. Titanización por el método sol-gel. ....	19
3.4.5. Formación del hidruro sobre sílica titanizada.....	21
3.4.6. Hidrosililación.....	22
3.4.7. Ángulo de contacto.....	22
3.4.8. Medición de movilidad electroosmótica.....	23
3.4.9. Hidrólisis alcalina.....	25

3.4.9.1.	Hidrólisis alcalina en <i>wafers</i> modificados.....	26
3.4.9.2.	Hidrólisis alcalina en capilares modificados.....	26
<b>4.</b>	<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</b>	<b>28</b>
4.1.	MÉTODO DE INCORPORACIÓN TITANIO.....	28
4.2.	CARACTERIZACIÓN DE SUSTRATOS TITANIZADOS.....	30
4.2.1.	CARACTERIZACIÓN DE TiO <sub>2</sub> SOBRE SÍLICA PARTICULADA.....	31
4.2.2.	TOPOGRAFIA DE SUSTRATOS DE SÍLICA MODIFICADOS CON TiO <sub>2</sub> .....	33
4.3.	HIDRÓLISIS ALCALINA.....	36
<b>5.</b>	<b>CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....</b>	<b>40</b>
<b>6.</b>	<b>BIBLIOGRAFIA.....</b>	<b>41</b>



## LISTA DE FIGURAS

	Pág.
<b>Figura 1.</b> Esquema de un sistema simple para electroforesis capilar.....	5
<b>Figura 2.</b> Sistema de pretratamiento de las columnas capilares.....	17
<b>Figura 3.</b> Goniómetro hecho en el laboratorio de Separaciones Analíticas de la Universidad del Valle.....	23
<b>Figura 4.</b> Gota de agua sobre <i>wafer</i> titanizado (anhidro)-hidrurado-CEB.....	23
<b>Figura 5.</b> Protocolo utilizado para medir la electroósmosis por el método acelerado.....	24
<b>Figura 6.</b> Complejo de titanio con <i>acac</i> .....	29
<b>Figura 7.</b> Espectros DRIFT de la sílica nativa y la sílica modificada con los dos métodos de titanización.....	31
<b>Figura 8.</b> Espectros de EDS sobre <i>wafer</i> . A) Modificado con titanio por sol-gel. B) Modificado con titanio bajo condiciones anhidras. C) <i>Wafer</i> nativo.....	33
<b>Figura 9.</b> Imagen AFM (20x20 $\mu\text{m}^2$ ) de sílica titanizada por el método sol-gel.....	34
<b>Figura 10.</b> Imagen AFM (20x20 $\mu\text{m}^2$ ) de sílica titanizada bajo condiciones anhidras.....	34
<b>Figura 11.</b> Imagen SEM sobre <i>wafer</i> (10x10 $\mu\text{m}^2$ ) A) Modificado con titanio bajo condiciones anhidras. B) Modificado con titanio por sol-gel. C) <i>Wafer</i> nativo.....	35
<b>Figura 12.</b> Imagen SEM sobre sílica particulada (5x5 $\mu\text{m}^2$ ) A) Modificada con titanio bajo condiciones anhidras. B) Modificada con titanio por sol-gel. C) Silica particulada nativa.....	36

**Figura 13.** Prueba de hidrólisis en *wafers*, ángulo de contacto vs. tiempo de exposición a *buffer* 20 mM de bicarbonato pH 10.3 a 40°C. Las barras de error corresponden  $\pm$  una desviación estándar (n=3).....37

**Figura 14.** Prueba de hidrólisis en capilares, EOM  $\times 10^{-8} \text{ m}^2/\text{V.s}$  vs. tiempo de exposición a *buffer* 20 mM de bicarbonato pH 10.3 a 40°C, bajo 100 psi de presión de aire. Las mediciones de EOM se hicieron a 30°C en *buffer* 20 mM MOPS a pH 7.0. En todos los casos, las barras de error (n=3) no se muestran por ser más pequeñas que el símbolo utilizado .....38

## LISTA DE TABLAS

	Pág.
<b>Tabla 1.</b> Volúmenes y concentraciones usados en la titanización anhidra....	18
<b>Tabla 2.</b> Volúmenes concentraciones usados en la titanización no anhidra...	20
<b>Tabla 3.</b> Índice de polaridad de varios solventes relevantes al presente trabajo.....	30

## LISTA DE ABREVIATURAS Y ACRONIMOS

Abrev.	Abreviatura
AFM	Atomic force microscopy
ATRP	<i>Atomic transfer radical polymerization</i>
BGE	<i>Background electrolyte</i>
CEB	Cloruro de etilbencilo
CE	<i>Capillary electrophoresis</i>
DRIFT	<i>Diffuse reflectance infrared fourier transform spectroscopy</i>
DTBHQ	Diterbutilhidroquinona
EDS	<i>Energy dispersive spectrum</i>
EOF	<i>Electroosmotic flow</i>
EOM	<i>Electroosmotic mobility</i>
GC	<i>Gas chromatography</i>
HCl	Ácido clorhídrico
HPCE	<i>High performance capillary electrophoresis</i>
HPLC	<i>High performance liquid chromatography</i>
IR	<i>Infrared</i>
MOPS	Ácido 3-(n-morfolino)propanosulfónico
NaOH	Hidróxido de sodio

RMN	Resonancia magnética nuclear
SEM	<i>Scanning electron microscopy</i>
SGE	<i>Slag gel electrophoresis</i>
TES	Trietoxisilano
THF	Tetrahidrofurano
TPT	Tetraisopropóxido de titanio
UV/VIS	Ultravioleta/visible
XPS	<i>Spectrometry photoelectronic ray X</i>
v	Velocidad del ion
$\mu_{ep}$	Movilidad electroforética

## RESUMEN

El presente trabajo hace parte de un proyecto mayor que busca mejorar la estabilidad hidrolítica de los recubrimientos orgánicos anclados a la pared interna de los capilares usados en CE mediante la incorporación previa de óxido de titanio bajo la capa del hidruro intermediario involucrado. Para caracterizar adecuadamente los materiales obtenidos se titanizaron tres tipos de sustratos de sílica: sílica particulada, *wafers* (láminas) y tubos capilares. Se utilizó sílica particulada para estudios de IR y EDS; para estudios de superficie se emplearon *wafers* de sílica; capilares o tubos de sílica se emplearon en estudios de CE. La incorporación de titanio a la sílica se realizó de dos formas, en condiciones anhidras y con una cantidad controlada de agua en la reacción. Una vez titanizada la sílica, esta se sometió a hidruración y, finalmente, a hidrosililación con cloruro de p-vinilbencilo.

Se encontró que el nuevo método de titanización no favorece la estabilidad hidrolítica de la fase enlazada de CEB, en comparación con el sustrato titanizado en condiciones anhidras, y aún con aquel sin titanizar. Presumiblemente, la deposición del óxido de titanio no es tan eficaz como con el método en condiciones anhidras.

## 0. INTRODUCCIÓN

Electroforesis capilar, es una técnica analítica que emplea un campo eléctrico para la separación de analitos dentro de tubos muy angostos. Esta técnica, relativamente nueva, es actualmente una de las herramientas más versátiles y de más rápido desarrollo en las ciencias de separación. No obstante, presenta inconvenientes en los recubrimientos internos sobre las paredes de los capilares cuando se usan bajo pHs extremos. Aunque un buen número de investigadores ha desarrollado diferentes métodos en la búsqueda de mejores recubrimientos, la estabilidad hidrolítica de estos aún es tema de investigación. El proyecto “madre” del presente trabajo se basa en un esquema sintético completamente distinto a todos los utilizados en la fabricación de fases estacionarias, que sustenta la estabilidad de la fase enlazada en el anclaje Si-C. La finalidad del proyecto madre es la obtención de una fase estacionaria hidrofílica muy resistente a la hidrólisis que sea inerte a las interacciones con proteínas.

El énfasis del presente trabajo es sobre el mejoramiento adicional de la estabilidad hidrolítica de la fase enlazada mediante la incorporación de una capa de óxido de titanio sobre la cual se adiciona hidruro de silicio y posteriormente un iniciador de polimerización (cloruro de etilbencilo, CEB). De esta manera se intenta contribuir al objetivo general del proyecto mayor que busca remediar la limitada estabilidad hidrolítica de las fases enlazadas en CE.

## 1. OBJETIVOS

### OBJETIVO GENERAL

Contribuir a la solución del problema analítico asociado con la todavía insatisfactoria estabilidad hidrolítica de los recubrimientos orgánicos presentes en las paredes internas de los tubos de sílica utilizados actualmente en CE.

### OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Desarrollar un método simple y eficiente para incorporar óxido de titanio entre el sustrato de sílica (láminas, capilares y micropartículas) y el hidruro intermediario.

Estudiar las diferentes variables que afectan la incorporación de óxido de titanio mediante medidas de topografía atómica (AFM), ángulo de contacto y espectrales (IR y NMR).

Tomando como prototipo sílica enlazada con cloruro de etilbencilo, evaluar la estabilidad hidrolítica de las nuevas fases en *wafers* y capilares, comparando con los mismos sustratos no titanizados



## 2. MARCO TEÓRICO Y ANTECEDENTES

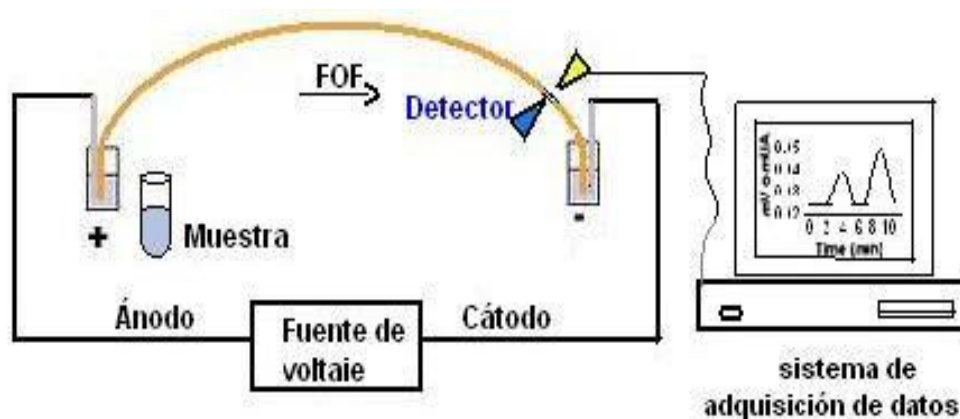
### 2.1. HPCE: PODEROSA HERRAMIENTA ANALÍTICA:

Durante las tres décadas pasadas, técnicas analíticas como la cromatografía de gas (GC) y la cromatografía líquida de alto desempeño (HPLC) han conducido a separaciones, identificaciones y cuantificaciones exitosas de miles de compuestos. Una técnica relativamente nueva, la electroforesis capilar de alto desempeño comercializada hace más de una década, es actualmente una herramienta analítica de rápido desarrollo en las ciencias de separación. Su vertiginoso ascenso en popularidad es un resultado directo de sus enormes beneficios que HPCE ofrece, como su rapidez y alta eficiencia, que permiten una separación superior de una amplia variedad de compuestos, convirtiéndola en una herramienta de gran interés especialmente en el campo de la bioquímica por su gran cantidad de aplicaciones en el análisis de aminoácidos, péptidos, proteínas, fragmentos de restricción del DNA, carbohidratos, vitaminas, ácidos orgánicos, polímeros, fármacos, tintes e, inclusive, partículas de virus y células enteras [1,2].

HPCE reemplaza efectivamente muchas separaciones realizadas mediante la dispendiosa técnica de electroforesis convencional con geles (SGE, *slag gel electrophoresis*) reduciendo drásticamente el tiempo requerido para obtener resultados (de horas a minutos y, a menudo, segundos). En HPCE, un detector en línea permite identificar rápidamente los analitos, en contraste con los demorados pasos de revelado requeridos en SGE. Esta situación ventajosa se debe a la habilidad de dispersar y controlar el calor rápidamente a través de tubos capilares tan estrechos (25 a 100  $\mu\text{m}$  de diámetro interno), permitiendo la aplicación de un potencial eléctrico más elevado (10 a 30 KV) que reduce los tiempos de separación. La rapidez, sensibilidad y versatilidad para el análisis, hacen de HPCE una técnica muy atractiva para muchos científicos [2,3].

## 2.2. ELECTROFORESIS CAPILAR DE ALTO DESEMPEÑO

Se denomina electroforesis a la migración diferencial de partículas en un campo eléctrico. En un análisis típico por HPCE (ver Figura 1), un extremo del capilar se sumerge en un reservorio que contiene solución *buffer*. El otro extremo del capilar se sumerge en la muestra de interés y mediante una diferencia de presión o de voltaje se inyecta un pequeño volumen de muestra (normalmente 1-500 nL). Este extremo del capilar se sumerge posteriormente en otro reservorio que contiene la misma solución *buffer* y posteriormente se aplica un potencial (típicamente, alrededor de 10 a 30 KV) a través de electrodos de platino. La separación ocurre como resultado de las diferencias de movilidad electroforética de los analitos. El flujo electroosmótico, generado por el campo eléctrico mueve la solución entera del ánodo hacia el cátodo, permitiendo la detección simultánea de todos los solutos sin importar la carga, a medida que pasan por la ventana óptica del capilar. Un sistema de adquisición de datos en línea permite obtener el electroferograma del análisis realizado.



**Figura 1.** Esquema de un sistema simple para electroforesis capilar.

La separación mediante electroforesis está basada en las diferencias en la velocidad de los solutos en un campo eléctrico, la cual se puede expresar como

$$v = \mu_{ep}E \quad (\text{ec. 1})$$

Donde

$v$         velocidad del ion

$\mu_{ep}$      movilidad electroforética

$E$         campo eléctrico aplicado

La movilidad electroforética de un ion determinado (en un medio dado) es una constante que caracteriza dicho ion, siendo valor positivo para cationes y de valor negativo para aniones. Las especies neutras no poseen movilidad electroforética. La movilidad electroforética depende de la composición de la solución *buffer*, del potencial aplicado y del tipo y radio del ion. Durante una separación bajo condiciones constantes de flujo, los iones en movimiento experimentan fuerzas de fricción con el medio (solución) y por tanto los más pequeños y altamente cargados poseen altas movilidades, mientras los más grandes y mínimamente cargados poseen bajas movilidades [4].

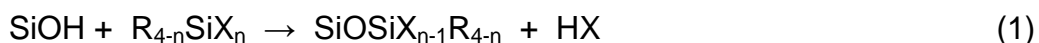
Electroósmosis es el fenómeno de transporte del electrolito a través del tubo capilar, cuando en los extremos de este se aplica un potencial eléctrico. Dicho flujo es consecuencia directa del potencial zeta originado por las distribución de cargas eléctricas en la interfase pared/solución (doble capa) en el interior del capilar de sílica, por lo cual el EOF depende del pH de la solución *buffer*. El potencial zeta se deriva de las teorías de Gouy-Chapman y Stern [5].

La movilidad electroosmótica (EOM) se determina tradicionalmente midiendo el tiempo que toma en viajar un marcador neutro la distancia inyección-detección, bajo la aplicación de un campo eléctrico. Este método a pesar de su simplicidad, tiene la desventaja que, en flujos electroosmóticos bajos, las mediciones de EOM son muy lentas. En 1996 Sandoval y Chen desarrollaron

un método para medir de forma rápida la EOM en tubos capilares [6]. Este método se realiza a partir de la inyección de dos marcadores que encierran el electrolito (*buffer*) en forma de *sandwich*. Después de la primera inyección se aplica el campo eléctrico por un tiempo determinado. Enseguida se hace la segunda inyección y finalmente el conjunto marcador-electrolito-marcaador son empujados por el tubo capilar mediante la aplicación de un gradiente de presión, mientras la señal se monitorea de forma usual. Este método en relación con el tradicional, acorta el tiempo de medida y alarga la vida útil de la solución *buffer*, permitiendo múltiples medidas de la EOM sin cambio significativo del pH.

### 2.3. FASES ENLAZADAS

En CE la modificación química de la superficie se realiza con el fin de eliminar las interacciones entre la pared interna del capilar y los constituyentes de la muestra bajo análisis, evitando separaciones de baja eficiencia. Con este propósito se han realizado numerosos estudios enlazando grupos orgánicos al sustrato de sílica [7-9], donde tradicionalmente los grupos silanol, SiOH, de la superficie reaccionan con agentes organosilanos del tipo  $R_{4-n}SiX_n$  (donde R es un grupo orgánico, X es un grupo que se hidroliza fácilmente, comúnmente cloruro, y n puede tomar valores entre 1 y 3):

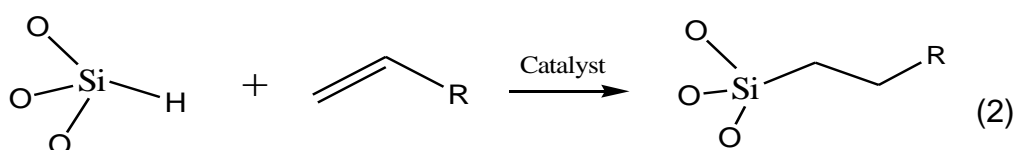


Esta metodología, aunque versátil y relativamente simple de implementar, padece de muchas deficiencias como la remoción incompleta de los grupos silanol, así como una alta susceptibilidad de ruptura del enlace Si–O–Si a pHs relativamente moderados (baja estabilidad hidrolítica). Esta limitación es responsable de picos con largas colas y recuperación incompleta de solutos debido a las interacciones de estos con los grupos silanol remanentes (interacciones “silanofílicas”) [10], lo cual dificulta la cuantificación. La limitación de estabilidad hidrolítica de las fases enlazadas ha recibido mucha atención en los últimos años, tanto en LC como CE. En LC, el uso prolongado

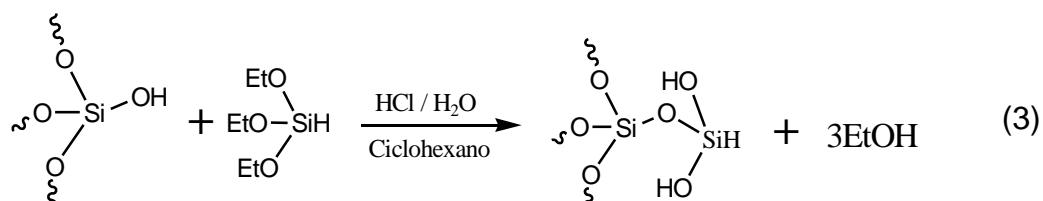
de fases móviles que contienen ácido trifluoroacético acuoso o *buffers* a bajo pH conlleva a la degradación del material enlazado y, por consiguiente, al incremento de la exposición de los grupos silanoles y la contaminación de los productos de separación.

Para solucionar este problema de inestabilidad, Wirth *et al.* desarrollaron un método conocido como “polimerización horizontal” [11], en el cual se usa una mezcla de organosilanos trifuncionales, típicamente octadeciltriclorosilano y n-propiltriclorosilano. En este método la reacción de los grupos alquilsilanos se confina a la superficie de la sílica mediante la humidificación controlada del sustrato, lo cual resulta en un fuerte entrecruzamiento Si-O-Si paralelo a la superficie de sílica. Esta metodología se ha aplicado exitosamente en la preparación de recubrimientos hidrolíticamente estables para CE. Kirkland *et al.*, por otro lado, sintetizaron una variedad de fases estacionarias con silanos bidentados en los cuales dos átomos de silicio están unidos por metilenos ((CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>, donde n = 2 o 6) o éteres que forman dos enlaces con la superficie de la sílica por unidad de silano [12].

Al final de la década de los 80s, Sandoval *et al.* desarrollaron una nueva metodología para la formación de un enlace Si-C sobre el sustrato de sílica, utilizando como reacción primaria la adición catalítica del hidruro de silicio a una olefina terminal, reacción conocida como hidrosililación [13] :



El grupo SiH se enlaza previamente a la superficie de la sílica mediante la reacción de los grupos silanol de la superficie con trietoxisilano (TES) en presencia de agua, HCl como catalizador y en ciclohexano como solvente:



Esta metodología es una modificación de aquella empleada por Kessel y Granick [14], y se usa en este trabajo.

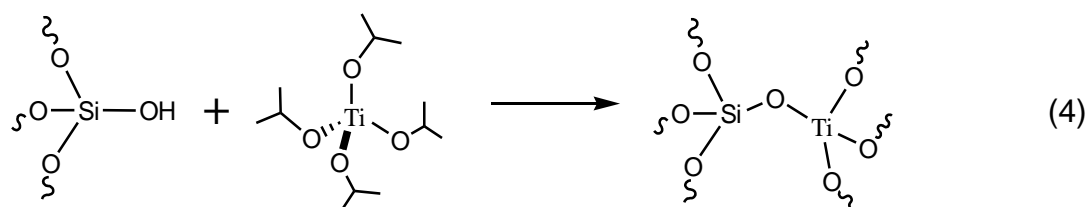
## **2.4. INCORPORACIÓN DE TITANIO SOBRE SÍLICA**

Las películas de óxido de titanio han sido ampliamente estudiadas por sus interesantes propiedades químicas, ópticas y eléctricas [15,16], y se han reportado varios métodos para la modificación de sustratos con diferentes propósitos. Cuando la deposición del óxido de titanio es seguida por tratamiento térmico (varios cientos de grados centígrados), se ha encontrado que el titanio presenta dos fases, conocidas como anatasa y rutilo [17]. Estos dos tipos de estructuras confieren a los sustratos titanizados diferentes propiedades ópticas y catalíticas

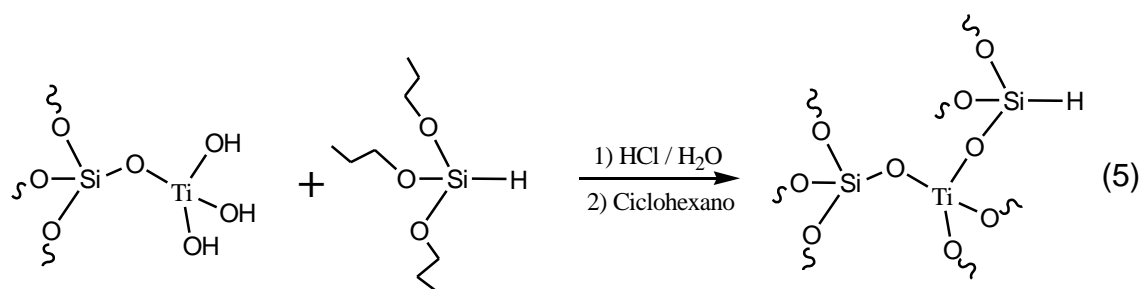
En el marco de la modificación química de sustratos de sílica se considera como avance importante la incorporación de óxidos de metales como titanio y zirconio en columnas de LC y CE con el fin de mejorar la estabilidad hidrolítica de las fases enlazadas [18,19]. Generalmente, la incorporación de óxidos de titanio sobre la pared del sustrato de sílica usa como precursores haluros y alcóxidos de titanio [20] que sufren numerosas reacciones de hidrólisis y policondensación que conllevan a la formación de polímeros (*clusters* de titanio) en solución, un proceso conocido como “*sol-gel*” [21, 22]. Dichos *clusters* reaccionan con los silanoles de la sílica formando un sustrato “titanizado” que se modifica posteriormente con diferentes tipos de organosilanos, comúnmente octadecilsilanos [23]. A diferencia de los métodos citados arriba que incluyen calcinación, la titanización de la sílica para obtener fases estacionarias se realiza a temperaturas que van desde la ambiental hasta aquella de reflujo del solvente utilizado (agua, alcoholes, tolueno, etc.). El resultado es una película amorfa similar a la del sustrato de sílica, por ejemplo. Fonseca *et al.* desarrollaron un método que involucra la deposición de titanio en condiciones

anhidras, usando como precursores alcóxidos de titanio los cuales son hidrolizados después de la reacción [24].

La estabilización hidrolítica de las fases enlazadas que resultan de la incorporación de óxido de titanio sobre el sustrato de sílica es un objetivo de esta investigación. Los antecedentes en la literatura han demostrado que el titanio mejora considerablemente la estabilidad hidrolítica de las fases enlazadas sobre la sílica a pHs altos [25, 26, 10]. En el presente trabajo se exploran dos métodos de titanización sobre sílica particulada y sílica plana (*wafers* y capilares) usando como precursor el tetraisopropóxido de titanio (TPT) :

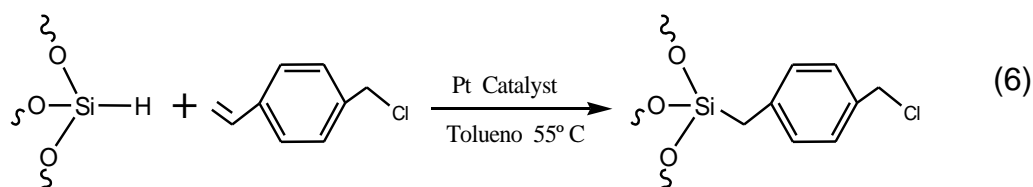


Un primer método se basa en el proceso *sol-gel* e involucra tres pasos: la *prehidrólisis* del TPT en presencia de una pequeña cantidad de agua y HCl en THF; la *dilución* masiva del hidrolizado en un solvente no polar; y la *deposición* sobre el sustrato. El segundo método se basa en la simple deposición del mismo TPT en condiciones anhidras, seguida por la hidrólisis de los grupos alcóxidos remanentes (ver reacción 4). El sustrato modificado ahora está listo para ser hidrurado con TES [29]:

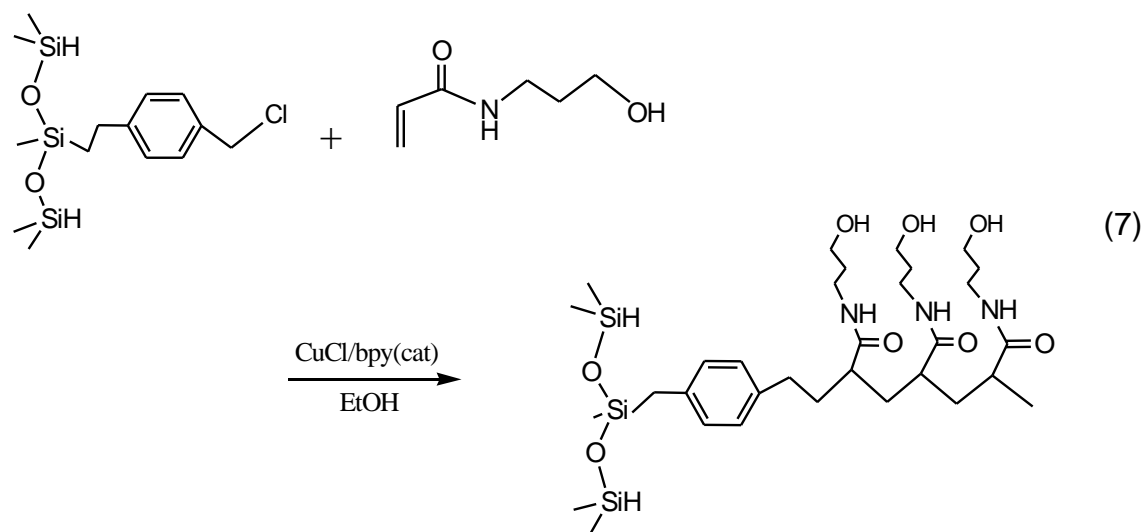


## 2.5. POLIMERIZACION

La finalidad del proyecto madre al cual está vinculada esta investigación es la obtención de un polímero hidrofílico sobre la superficie de los capilares, con el propósito de obtener una fase muy estable a la hidrólisis y compatible con la separación de proteínas. El método de polimerización controlada empleado en el proyecto es ATRP (*atomic transfer radical polymerization*). Este método implica la presencia de un iniciador anclado en la superficie sobre la cual se deposita el polímero. Uno de los iniciadores, cloruro de etilbencilo, ha sido ampliamente estudiado por el grupo de investigación. El grupo cloruro de etilbencilo se enlaza a la superficie hidrurada del capilar mediante la reacción de hidrosililación con cloruro de p-vinilbencilo:



Es sobre este iniciador que se realizarán las pruebas de estabilidad hidrolítica en la presente investigación. Una vez anclado el iniciador, la reacción de polimerización se realiza mediante el siguiente proceso ATRP:





### 3. PARTE EXPERIMENTAL

#### 3.1. EQUIPOS

Todos los experimentos se llevaron a cabo en un instrumento de electroforesis capilar Agilent, modelo 3D CE system (U.S.), equipado con automuestreador de carrusel para 48 viales, sistema de vacío para lavados en doble dirección con 1 a 50 mbar o alta presión de 2 a 12 bar, sistema de inyección por presión (0 a 50 mbar) o electrocinético (0 a 30 KV), y un sistema de detección UV/VIS con arreglo de diodos (190-600 nm). La adquisición de datos se hizo mediante una interface 82357B USB/GPIB conectada a un PC con software de control y análisis HP Chemstation™ Rev. B. 03.0x. Para el tratamiento térmico de los capilares se empleó el horno de un cromatógrafo de gases Hewlett-Packard, modelo 5890, al cual se le retiraron los sistemas de inyección y detección. Para la medición de ángulos de contacto sobre los *wafers* se empleó un goniómetro hecho en casa. Este se construyó a partir de un microscopio Leica Galen fuera de servicio, al cual se adaptó un microscopio digital USB 2.0 (China) y una jeringa de 10 µl Hamilton Corp. (U.S.). Los ángulos de contacto se calcularon con el software de licencia libre, *Image J* versión 1.43, usando el *plug-in Drop-Analysis*, disponibles en el sitio *web* del National Institute of Health y en el sitio *web* de la Ecole polytechnique Federale en Lausanne, Suiza. Para determinar la rugosidad de los recubrimiento sobre los *wafers* se empleó un equipo de AFM (*atomic force microscopy*) Asylum Research modelo MFP-3D-SA (U.S.). Para la caracterización de los sustratos de sílica particulada se empleó un espectrómetro de IR Nicolet modelo 6700 FT-IR, de Thermo Scientific (Alemania), equipado con un accesorio de reflectancia difusa. Las imágenes de SEM fueron tomadas con un equipo SEM (*scanning electron microscopy*) modelo 7573 de Oxford Instruments (Inglaterra). Las mediciones de contenido de titanio en sílica particulada se efectuaron con una sonda EDS adaptada al instrumento. Para la medición de pH de las soluciones se empleó

un pHmetro CG 8-32, Nr 300512 (Alemania). Para la agitación de soluciones se empleó un agitador tipo *vortex* de Scientific Industries, modelo AB1A3201 (U.S.), una plancha agitadora de Corning, modelo PC-41D (U.S.) y un equipo de ultrasonido Branson de Ultrasonics Corp, modelo B200 (U.S.). Para la separación de solventes de sílica particulada se usó una centrifuga de MSE-MINOR, modelo 4-71 (Inglaterra). Para pesar reactivos y materiales se usó una balanza Precisa 40SM-200A, modelo 50503 (Suiza). El secado de materiales se realizó en un horno de Pjtech, modelo Th53 (Colombia). En la destilación de solventes se usó una manta de Glas-Col® (U.S.) conectada a un reóstato de Ace-Glass INC (U.S.)

### 3.2. MATERIALES

Los capilares de sílica de 50  $\mu\text{m}$  de diámetro interno fueron obtenidos de Biotaq Inc. (U.S.). Los *wafers* de sílica Corning 7980 (76.2 mm  $\times$  25.4 mm  $\times$  1 mm) se obtuvieron de Bioindustrial Products (U.S.), y se cortaron posteriormente a 25.4 mm  $\times$  9 mm  $\times$  1 mm usando un disco de carburo de silicio de Keystone Industries (U.S.). La sílica particulada Kromasil (100 Å de diámetro de poro y 330 m<sup>2</sup>/g área) fue de Eka Nobel (Suecia). La cerámica para el corte de capilares fue obtenida de Polymicro Technologies (U.S.). Para la elaboración de la ventana óptica de los capilares se emplearon cuchillas de acero obtenidas de VWR Scientific Products (U.S.). En el tratamiento dinámico y secado de los capilares se empleó nitrógeno seco obtenido de Cryogas (Colombia). Para el sistema de inyección del instrumento de HPCE, se empleó aire seco obtenido de Cryogas. En la limpieza de los *wafers* se empleó jabón marca Micro manufacturado por International Products Corporation (U.S.). La filtración de las soluciones se realizó a través de membranas de 0.45  $\mu\text{m}$  obtenidas de Millipore Corp (U.S.). Para la manipulación de soluciones o solventes en atmósfera inerte se emplearon jeringas *gas-tight* de diferentes volúmenes (0.5, 1, 2.5 y 5 mL) compradas a Hamilton Corp. (U.S.). Las agujas fueron compradas a Scientific Glass Engineering (Australia). Para evitar la

exposición de las soluciones a la humedad se emplearon *septa* tamaños 10-30 y 24-40 comprados a Sigma-Aldrich (U.S.).

### **3.3. REACTIVOS**

El reactivo empleado para la titanización fue el tetraisopropóxido de titanio, TPT, comprado a Sigma-Aldrich. El trietoxisilano, TES, fue el reactivo usado para la hidruración y fue comprado de Alfa Aesar (U.S.). El bicarbonato de sodio grado analítico fue comprado a Panreac Química S.A. (España). La olefina terminal anclada al hidruro intermediario fue el cloruro de 4-vinilbencilo comprado a Sigma-Aldrich. El catalizador empleado en la reacción de hidrosililación fue el ácido cloroplatínico hexahidratado comprado a Sigma-Aldrich. El inhibidor de radicales para la hidrosililación fue el 2,5-di-*tert*-butil-hidroquinona (DTBHQ) comprado a Sigma-Aldrich. Los solventes tetrahidrofurano (THF) y ciclohexano fueron comprados a Sigma-Aldrich. El tolueno grado HPLC fue comprado a Mallinckrodt (U.S.). Para la preparación de la solución *buffer* usada como electrolito en CE se empleó MOPS, comprado a GFS Chemicals (U.S.). El alcohol bencílico usado como marcador neutro en las mediciones de EOM fue comprado a Sigma-Aldrich. El hidróxido de sodio y ácido clorhídrico fueron comprados a Fluka-Analytical (U.S.). El agua usada en la preparación de disoluciones fue destilada y desionizada en equipo Purelab Classic comprado a Elga Labwater (Inglaterra).

### **3.4. PROCEDIMIENTOS**

#### **3.4.1. SECADO DE SOLVENTES**

Solventes como el THF, ciclohexano y tolueno, usados en la preparación de soluciones de TES y TPT (reactivos altamente hidrolizables) fueron secados previamente para eliminar la mayor cantidad de agua posible y garantizar así que los reactivos no se hidrolicen antes de lo previsto. Sodio metálico fue

empleado para eliminar el agua de estos solventes. Los solventes fueron puestos en agitación con láminas delgadas de este metal durante 24 horas; posteriormente fueron destilados antes de usar.

### 3.4.2. PREPARACIÓN DE SOLUCIONES

La solución patrón de TPT 0.1 M usada en condiciones no anhidras, fue preparada tomando alrededor de 0.3 mL del reactivo de titanio (TPT, 97% de pureza) y disolviéndolo con THF en un matraz de 10 mL completamente seco. En la metodología de condiciones anhidras se preparó una solución patrón 5 mM de TPT tomando alrededor 150  $\mu$ L del TPT y se llevó hasta el aforo con tolueno seco en un matraz de 10 mL bajo atmósfera de nitrógeno. Los cálculos para la preparación de estas soluciones fueron realizados partiendo del contenido de Ti en el reactivo de titanio, 27.9% como  $\text{TiO}_2$ .

Para la preparación de la solución patrón de TES 0.1 M se tomó alrededor de 0.2 mL del reactivo TES (96% de pureza) y disolviéndolo en THF en un matraz de 10 mL. Al igual que la preparación de la solución patrón de titanio, la solución de TES fue preparada con altas precauciones para no exponer el reactivo al medio ambiente y de esta manera evitar su hidrólisis.

El ácido cloroplatínico, catalizador empleado en la reacción de hidrosililación, fue preparado bajo atmósfera de nitrógeno. Del reactivo se tomaron 130 mg y se disolvieron en 2.8 mL de isopropanol, para obtener una concentración 0.1M del catalizador.

La solución *stock* 250 mM del *buffer* MOPS, empleado en el acondicionamiento y medición de electroósmosis en los capilares, fue preparada tomando 5.23350 g para disolverlos en 100 mL de agua desionizada, luego de lo cual se ajustó el pH a 7.0 con NaOH 0.1 M. Esta solución se diluyó 100 veces y finalmente la solución se filtró a través de una membrana 0.45  $\mu$ m y se verificó el pH.

Para la preparación del marcador neutro alcohol bencílico (útil en todo el rango de pH 0-14) se partió de una solución *stock* de 100 mM, preparada disolviendo

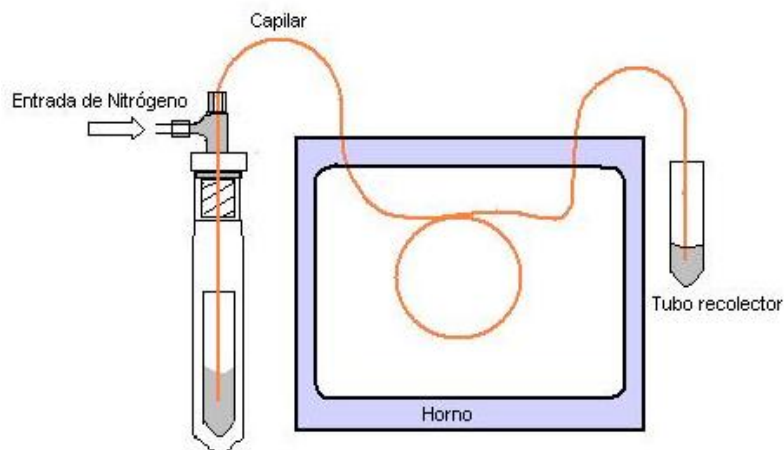
112.5  $\mu\text{L}$  del compuesto puro en 10 mL de agua desionizada. Para la preparación de las muestras de concentración 5.0 mM, se tomaron alícuotas de 25  $\mu\text{L}$  de la solución *stock* y se llevaron a un volumen de 500  $\mu\text{L}$  con el BGE.

El HCl empleado en la hidrólisis de TES se preparó tomando una alícuota de 146  $\mu\text{L}$  del HCl concentrado (6.37%, 12.02 M) y se completó con agua desionizada a un mL. EL HCl empleado en el hidrolizado del TPT (método en condiciones no anhidras) se preparó tomando 45.6  $\mu\text{L}$  del HCl concentrado y se completó a un mL con agua desionizada. La concentración final de las soluciones *stock* de HCl empleadas la hidruración y en la titanización en condiciones no anhidras fueron de 1.75 M y 0.55 M respectivamente.

Las pruebas de hidrólisis realizadas sobre *wafers* y capilares se llevaron a cabo con solución *buffer* de carbonato de sodio 20 mM de pH 10.3. La solución se preparó a partir de una solución *stock* 200 mM con pH de 10.3. De esta solución se tomaron 10 mL y se disolvieron en agua hasta completar 100 mL

### **3.4.3. PRETRATAMIENTOS DE WAFERS Y COLUMNAS CAPILARES**

La metodología empleada en el pretratamiento de capilares y *wafers* fue aquella desarrollada por Gómez y Sandoval [27]. Capilares de 4 m de longitud fueron tratados con NaOH 1M a 100 psi durante 2 horas, con posterior enjuague con agua desionizada a 80 psi por una hora. Posteriormente, para incrementar la población de silanoles, el capilar se trató con HCl 6M durante 1 hora con una presión de 100 psi a 100 °C con posterior enjuague con agua desionizada a 80 psi por una hora. El secado se realizó con flujo de nitrógeno a 40 psi y 110°C durante 4 horas. Este procedimiento se realizó en el sistema que se muestra en la Figura 2.



**Figura 2.** Sistema de modificación química de las columnas capilares

Exceptuando la presurización, los *wafers* de sílica fueron pretratados mediante la metodología empleada en los capilares. Además, debido a la susceptibilidad de los *wafers* a engrasarse, se incorporó un lavado de estos con una solución al 2% v/v de jabón Micro, seguido por enjuagues con agua y THF.

#### **3.4.4. TITANIZACIÓN**

En esta investigación se exploraron dos métodos de titanización. Uno bajo condiciones anhidras y otro, conocido como sol-gel, en el cual el TPT es prehidrolizado diluido y depositado sobre la sílica.

##### **3.4.4.1 TITANIZACIÓN EN CONDICIONES ANHIDRAS**

Este método requiere de grandes precauciones para no exponer el TPT a la humedad del medio. Pese a esto, la aplicación del método es muy simple, puesto que solo involucra la preparación de la disolución de TPT en tolueno seco. Las concentraciones usadas en este método varían de acuerdo al material a titanizarse, debido a las diferentes poblaciones de silanoles. La Tabla 1 muestra las condiciones experimentales de titanización en condiciones

**Tabla 1.** Volúmenes y concentraciones empleados durante la titanización en condiciones anhidras.

Material de sílica	Relación molar TPT/SiOH	Concentración de TPT (mM)	Volumen final de reacción (mL)
<i>Wafers</i>	1300	5	4
Partículas	2	200	25
Capilares	820	5	0.789*

\* Volumen total que se pasó por el interior del capilar

anhidras para cada sustrato de sílica. Cabe resaltar que la cantidad de moles calculada para la sílica se hizo teniendo en cuenta el número teórico de silanoles por metro cuadrado  $7.6 \mu\text{moles/m}^2$ . Este valor se considera como una constante y se ha determinado mediante técnicas de intercambio isotópico [28], entre otras.

Para su titanización, los *wafers* se sumergieron en tubos de ensayo que contenían la solución reaccionante. Después de tapados, los tubos se colocaron en el horno a  $60^\circ\text{C}$ ; un agitador magnético colocado debajo del horno controlaba la agitación durante las 4 horas de reacción. Una vez terminada esta, el *wafer* modificado se lava 3 veces con 3 mL de tolueno seco.

Para la titanización de capilares (4 m x 50  $\mu\text{m}$ ) se empleó el mismo sistema usado en su pretratamiento. La solución reaccionante se pasó a través del capilar durante 4 horas a  $60^\circ\text{C}$ , bajo una presión de 40 psi. Al terminar la reacción, el capilar modificado se lava con tolueno seco por 15 minutos a una presión de 80 psi.

Las condiciones de titanización de la sílica particulada que se muestran en la Tabla 2 fueron calculadas para 1 g de sílica, a  $60^\circ\text{C}$  durante 4 horas. La

solución reaccionante se agrega gota a gota desde un embudo de adición durante 30 minutos sobre la sílica nativa (no modificada) que inicialmente se encontraba dispersa en 5 mL de tolueno. Este volumen se tiene en cuenta en la preparación de la solución reaccionante. Un magneto mantiene una agitación constante durante las cuatro horas de reacción. Una vez terminada esta, el material modificado se lava 3 veces con 3 mL de tolueno seco.

Para eliminar los grupos isopropóxidos remanentes sobre la superficie de sílica titanizada, esta última se trata con HCl acuoso. Con este fin, se realizó un enjuague al sustrato de sílica con una solución 8:2 v/v de THF/HCl 5mM. Los capilares se exponen a la misma solución durante 15 minutos a una presión de 80 psi. Después de realizar estos enjuagues, el sustrato titanizado se secó durante 2 horas a 110 °C.

#### **3.4.4.2 TITANIZACIÓN POR EL METODO SOL-GEL**

La titanización en condiciones no anhidras es el otro método de incorporación de titanio desarrollado en esta investigación. Si bien se puede considerar como un proceso sol-gel, el método desarrollado es un poco diferente a procesos de sol-gel reportados en la literatura. El procedimiento realizado aquí para la titanización de *wafers* y capilares bajo condiciones no anhidras utiliza una solución *stock* 0.1 M de TPT en THF, de la cual se toman 6.0 mL para adicionarlos en un tubo de ensayo, que contiene 0.10 mL de acetil-acetonato (*acac*) como acomplexante y estabilizante del titanio. A esta solución se añaden 18 µL de HCl 0.55M y 4.9 mL de THF, para un total de 12 mL de solución de hidrolizado. Esta solución se diluyó por un factor de 100 en una mezcla de tolueno:ciclohexano (2:1 v/v). La concentración final en la solución reaccionante fue de 0.50 mM en TPT, 1.0 mM en agua, 1.0 mM en *acac* y 0.010 mM en HCl.

Debido a que el área de los *wafers* y capilares son del mismo orden de magnitud, las soluciones empleadas fueron iguales para estos sustratos. Sin embargo, el área en la sílica particulada es muchísimo mayor (alrededor de 5



órdenes de magnitud) que en los sustratos mencionados y por esta razón las concentraciones y volúmenes son mucho mayores. En este caso las concentraciones de los reactivos en el hidrolizado son 0.4 M TPT, 0.8M *acac*, 0.8 M H<sub>2</sub>O y 0.008 M HCl. El factor de dilución en la mezcla tolueno/ciclohexano se ajustó a 20. La Tabla 2 muestra las relaciones molares, la concentración de TPT en la solución reaccionante y los volúmenes empleados en la titanización por el método sol-gel.

En este método se emplearon los mismos montajes experimentales que se usaron en el método de condiciones anhidras. Sin embargo, el tiempo de exposición y la temperatura de reacción de la sílica con la solución TPT fueron diferentes, pasando de 4 horas y 40 °C a 30 minutos y temperatura ambiente (alrededor de 26°C) en el nuevo método.

En los lavados para la sílica titanizada el método sol-gel incluye dos enjuagues con 8:2 v/v THF:HCl 5mM para *wafers*, seguidos por 3 enjuagues con THF. Los lavados en capilares se realizaron con las mismas soluciones pasándose por el

**Tabla 2.** Volúmenes y concentraciones empleados en la titanización por el método sol-gel

Material de sílica	Relación molar TPT/SiOH	Concentración de TPT (mM)	Volumen final de reacción (mL)
Wafer	125	0.5	4
Capilares	51	0.5	0.0487*
Particulada	2	21.7	100

\*Volumen total que se pasó por el interior del capilar

interior del capilar a 80 psi durante 15 minutos. Finalmente los materiales modificados fueron secados a 110 °C durante 2 horas.

#### **3.4.5. FORMACIÓN DE HIDRURO SOBRE LA SILICA TITANIZADA**

La hidruración de la sílica (titanizada o nativa) realizada en esta investigación se basa en el trabajo realizado por Gómez y Sandoval [29]. Para la hidruración de los *wafers* y capilares, la solución reaccionante se obtiene por dilución (por un factor de 120) del hidrolizado (solución de TES, HCl, H<sub>2</sub>O y THF) con ciclohexano.

El procedimiento parte de la preparación de una solución *stock* 0.1M de TES en THF, bajo condiciones libres de humedad; se preparó además una solución 1.7 M de HCl (6.32%). De estas soluciones se toman alícuotas adecuadas para obtener un hidrolizado constituido de 0.005M HCl, 0.150M H<sub>2</sub>O y 0.050M TES. Esta solución, que debe ser totalmente translúcida, se agita durante 30 minutos a temperatura ambiente y se diluye en ciclohexano. Esta solución reaccionante resultó finalmente con una relación molar de TES/SiOH de 420 para *wafers* y 20 para capilares. Si bien la solución final de reacción para modificar *wafers* y capilares tenía cantidades iguales de reactivos, el volumen de dicha solución que pasó por el capilar solo fue de unos pocos microlitros. Esta es la causa de la notable diferencia en las relaciones molares descritas.

Se llevó a cabo la reacción de formación de hidruro sobre la superficie titanizada, la cual procedió durante 30 minutos a temperatura ambiente. Los *wafers* estuvieron en contacto con la solución reaccionante bajo agitación durante este periodo y los capilares fueron tratados pasando la solución reaccionante a una presión de 100 psi (flujo de 2.0 µL/min. Los lavados se realizaron con tres porciones de 3 mL de THF para los *wafers* y flujo continuo a 80 psi durante 15 minutos para los capilares. Finalmente, el secado se realizó durante 2 horas a 110 °C, con un flujo de nitrógeno a 40 psi en el caso de los capilares.

### 3.4.6. MODIFICACIÓN CON CLORURO DE ETILBENCIOLO

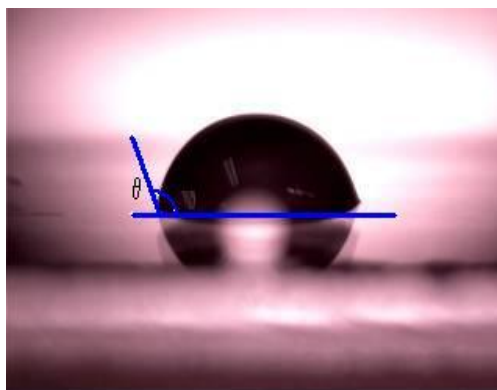
La hidrosililación es la fase final de recubrimientos realizados en esta investigación; este procedimiento involucra el anclaje de grupos CEB a la superficie del hidruro. Este proceso se llevó a cabo en *wafers* y capilares que fueron expuestos durante 20 horas y 55 °C a una solución que contenía cloruro de p-vinilbencilo 2.0 M, 5000 ppm de DTBHQ como inhibidor de radicales libres y 0.25 mM de ácido cloroplatínico como catalizador y tolueno como solvente. Cada *wafer* fue modificado con 4 mL de esta solución reaccionante, mientras que en los capilares (4m x 50  $\mu$ m) se aplicó una presión de nitrógeno de 50 psi para empujar la solución. Los flujos medidos fueron 36.4  $\mu$ L/h para el capilar modificado con titanio bajo el nuevo método, 44.6  $\mu$ L/h para el capilar titanizado en condiciones anhidras y 34.9  $\mu$ L/h para el capilar no titanizado.

### 3.4.7. ÁNGULOS DE CONTACTO

La medición de ángulo de contacto permite conocer rápidamente si una superficie en estudio fue o no modificada químicamente, dependiendo de la naturaleza de la gota y de la superficie. Debido a su sencillez y utilidad, esta técnica fue empleada numerosas veces en esta investigación para conocer la efectividad de la modificación. Todas las mediciones de ángulos de contacto fueron realizadas con un goniómetro hecho en nuestro laboratorio (ver Figura 3). Gotas de 6  $\mu$ L de agua fueron depositadas desde una jeringa de 10  $\mu$ L en tres sitios diferentes del *wafer* bajo estudio. Del procesamiento de la imagen de la gota se obtiene el ángulo entre la superficie del sustrato y la perpendicular que ajusta al contorno de la gota (ver Figura 4). Un total de tres mediciones son obtenidas por *wafer* modificado.



**Figura 3.** Goniómetro construido en el laboratorio de Separaciones Analíticas de la Universidad del Valle



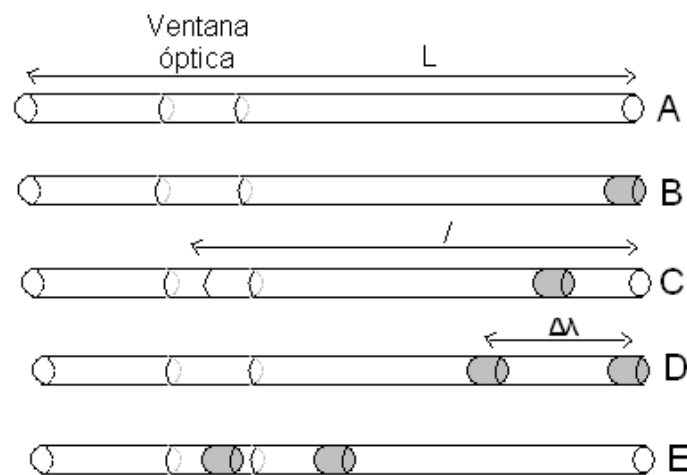
**Figura 4.** Gota de agua sobre *wafer* sometido a la secuencia de titanizado (anhidro)-hidrurado-CEB.

#### 3.4.8. MEDICIÓN DE LA MOVILIDAD ELECTROOSMÓTICA

Las medidas de movilidad electroosmótica se realizaron aplicando el método acelerado de Sandoval y Chen [30]. La Figura 6 describe el protocolo empleado en la medición del flujo electroosmótico para este método. A) Inicialmente se realiza el enjuague del capilar con BGE. B) Se hace una inyección neumática de marcador neutro durante un tiempo  $t_{inj}$ . C) Se aplica el potencial eléctrico,  $V$ , por un periodo de tiempo,  $t_v$ , para mover

electroosmóticamente el electrolito una distancia  $\Delta\lambda$ . D) Se realiza una segunda inyección del marcador. E) Se aplica una diferencia de presión entre los extremos de entrada y salida del capilar para que el *sándwich* marcador-electrolito-marcaador se desplace hasta alcanzar la ventana de detección y registrar los tiempos de movilización de los dos marcadores.

Las inyecciones del marcador se realizaron aplicando una diferencia de presión de 0.73 psi por un periodo de 3 segundos. El potencial eléctrico aplicado fue de 10 KV y su duración fue de 3 minutos, el *sándwich* marcador-electrolito-marcaador se movilizó mediante la misma diferencia de presión de 0.73 psi. Paralelamente a lo anterior se realizó el registro de la señal del detector a 206 nm para el alcohol bencílico, con lo cual se obtuvieron los tiempos de movilización de los dos marcadores



**Figura 5.** Esquema del protocolo utilizado para medir la electroósmosis por el método acelerado

Los cálculos de movilidad electroosmótica,  $\mu_{eo}$ , se realizaron aplicando la ecuación 2. Esta ecuación es una refinación de la original [6], que toma en consideración la longitud de las bandas del marcador inyectadas en el capilar [30].

$$\mu_{EO} = \frac{Ll}{Vt_v} \left( \frac{t_2 - t_1 - t_{inj}}{t_2 + \frac{1}{2}t_{inj}} \right) \quad (EC\ 2)$$

Donde

- L Longitud total del tubo capilar
- l* Longitud efectiva del capilar (desde la entrada hasta la ventana óptica, 42.5 cm en nuestro caso)
- t<sub>inj</sub>* Tiempo de inyección del marcador
- t<sub>1</sub>, t<sub>2</sub>* Tiempo de movilización para la primera y segunda banda del marcador
- V Potencial eléctrico aplicado
- t<sub>v</sub>* Duración del potencial eléctrico (tiempo de electromigración del BGE)

La ventana óptica hecha sobre los capilares se basa en un procedimiento desarrollado previamente por nuestro grupo de investigación. Inicialmente se localiza y marca la sección de la poliimida a remover (42.5 cm desde la entrada); posteriormente se posiciona la cuchilla sobre el área marcada y sin levantarla se realizan movimientos hacia delante y hacia atrás de forma tal que gire el capilar mientras se hacen cortes en forma de espiral. Las virutas de poliimida se retiran con papel suave empapado con etanol y se verifica visualmente la ventana. Típicamente, este procedimiento produce una ventana con una amplitud de 2 mm.

### 3.4.9. HIDRÓLISIS ALCALINA

Los capilares y *wafers* químicamente modificados con CEB como fase final enlazada fueron sometidos a hidrólisis en medio alcalino con una solución reguladora de carbonato de sodio de pH 10.3. El estudio de hidrólisis realizado en los capilares y *wafers* se hizo, respectivamente, con mediciones de EOM y

ángulo de contacto a diferentes tiempos de exposición del material a la solución de carbonato.

#### **3.4.9.1 HIDRÓLISIS ALCALINA EN WAFERS MODIFICADOS**

El procedimiento experimental consistió en sumergir el *wafer* en 4 mL de la solución de hidrólisis durante determinado tiempo, después del cual el *wafer* se enjuaga con abundante agua y después con THF para facilitar su secado, que se realizó durante 15 minutos a 110 °C. Después de enfriado a temperatura ambiente, el *wafer* se somete a mediciones de ángulo de contacto (tres mediciones por *wafer*). Se estudiaron tres *wafers* modificados con CEB, dos de ellos previamente titanizados con los dos métodos mencionados arriba (en condiciones anhidras y en condiciones no anhidras) y un tercer *wafer* que no fue titanizado antes de su hidruración, pero fue modificación con el CEB.

#### **3.4.9.2 HIDRÓLISIS ALCALINA EN CAPILARES MODIFICADOS**

Para el estudio del efecto de la hidrólisis en los capilares modificados con CEB, se observó el cambio de la EOM a diferentes tiempos de exposición al *buffer* de carbonato de sodio. El procedimiento experimental realizado comenzó por someter el capilar a una hora de hidrólisis, para lo cual se hizo pasar la solución de carbonato a 100 psi (6.9 bars); posteriormente se enjuagó el capilar durante 5 minutos con agua también a 100 psi, y seguidamente se acondicionó el capilar con BGE de corrida (*buffer* 25 mM de MOPs a pH 7.0) durante 1 hora a 100 psi. Finalmente, se mide la EOM por triplicado. A medida que transcurría el experimento se variaron los tiempos de hidrólisis pasando de 2, 3 y hasta 6 horas en algunos capilares; fue necesario acondicionar por más de una hora el capilar a medida que el recubrimiento de la superficie se desgastaba. Se sometieron tres capilares a estos ensayos de hidrólisis alcalina: a) un capilar modificado con titanio en condiciones anhidras, hidrurado y luego modificado con CEB; b) un segundo capilar modificado con titanio en condiciones no

anhidras, hidrurado y con el recubrimiento de CEB similar al anterior; c) y un tercer capilar que no fue previamente titanizado pero sí modificado con hidruro y CEB.



## 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

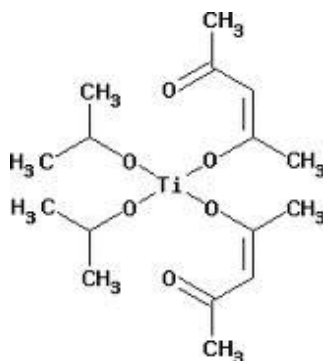
### 4.1. MÉTODOS DE INCORPORACIÓN DE TITANIO

El presente trabajo busca contribuir a la solución del problema analítico asociado con la insatisfactoria estabilidad hidrolítica de los recubrimientos orgánicos actuales en CE. Con este propósito se incorporó óxido de titanio entre el sustrato de silica y el hidruro intermediario, aplicando un método realizado bajo condiciones anhidras ya reportado en la literatura [26], u otro método nuevo bajo condiciones no anhidras, consistente en la secuencia prehidrólisis-dilución-deposición. Esta sección se refiere primariamente a este último.

Si bien el procedimiento experimental de incorporación de titanio mediante el nuevo método fue descrito arriba, es importante mencionar que el desarrollo de este incluyó una intensa etapa cualitativa en la que se buscaban condiciones en que no ocurriera polimerización (precipitación) del material bajo prueba antes de la deposición sobre el sustrato. La idea era extender a la titanización el método de preparación del hidruro recientemente reportado por Gómez y Sandoval [29]. Sin embargo, la extrema sensibilidad a hidrolizarse del TPT en comparación con el TES, hizo del nuevo método de titanización un verdadero desafío.

Entre los experimentos preliminares se incluyó un estudio del hidrolizado (el producto de prehidrólisis) variando las concentraciones de agua, HCl y TPT. En todos los casos había formación de precipitado. Una revisión de la literatura sugería incorporar un nuevo reactivo, el acetilacetonato, *acac*, el cual actúa como acomplejante del titanio retardando así la precipitación (probablemente en forma de  $\text{TiO}_2$ ) del mismo [31]. El titanio se acompleja rápidamente con el *acac*, probablemente con la estructura que se muestra en la Figura 6, formando una solución color amarillo-rojizo. El primer problema fue entonces resuelto; el

hidrolizado no mostraba precipitado dentro de un rango amplio de concentración de TPT, siempre y cuando se conservara una relación molar *acac*/TPT cercana a la estequiométrica, 3/1.



**Figura 6.** Complejo de titanio con *acac*

Una vez estabilizado el hidrolizado, se estudió, también de manera cualitativa, su dilución en ciclohexano, buscando el rango de concentración de TPT que no formara precipitado de TiO<sub>2</sub>. Este objetivo, sin embargo no se logró. Aún en concentraciones muy bajas de titanio la solución presentaba nubosidad que al cabo de unos minutos se precipitaba en el fondo del tubo de ensayo. Claramente, el solvente de dilución, ciclohexano, era demasiado apolar y se requería un solvente con la suficiente polaridad para que no ocurriera la precipitación durante la dilución, pero no tanto como para que impidiera la deposición del titanio sobre el sustrato. Los “cromatografistas” (“*chromatographers*”, en Inglés) utilizan el “índice de polaridad”,  $P'$ , de un solvente como una medida relativa del grado de interacción del mismo con solutos polares [32].  $P'$  aumenta con un incremento en la polaridad del solvente. En la Tabla 4 puede observarse que el tolueno es la mejor escogencia. Sin embargo, este solvente resultaba inadecuado por cuanto interactuaba tan fuertemente con el hidrolizado (debido probablemente a su polarizabilidad) que impedía una deposición adecuada del titanio sobre el sustrato de silica. Ante esta dificultad, se decidió usar una mezcla de tolueno y ciclohexano para la dilución. Para buscar una relación de tolueno: ciclohexano que justamente no precipitara, se realizó de nuevo una serie de experimentos

cualitativos que finalmente llevó a una dilución total por un factor de 100 y una relación tolueno:ciclohexano de 2:1 v/v aproximadamente. La solución final obtenida exhibía un tono un poco perlado pero sin precipitación.

## 4.2. CARACTERIZACIÓN DE LOS SUSTRATOS TITANIZADOS

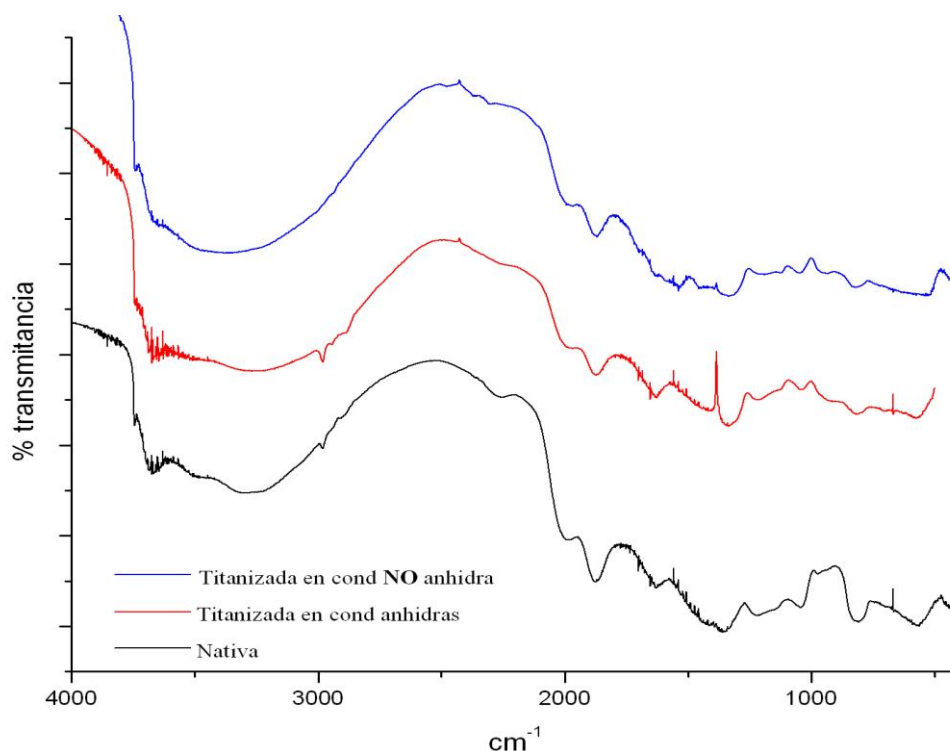
Los estudios de caracterización de los sustratos de sílica modificados se enfocaron en la incorporación efectiva de óxido de titanio sobre los sustratos de sílica. Se utilizaron varias técnicas que estaban disponibles en el campus de la universidad. Desafortunadamente, no disponía de un instrumento de XPS (*x-ray photoelectronic spectrometry*), aun a nivel del país, para confirmar con facilidad la efectiva titanización de la sílica. Los estudios de caracterización realizados se dividen en dos secciones, de acuerdo con la forma física del sustrato, micropartículas (espectroscopía) o *wafers* (microscopía).

**Tabla 3.** Índice de polaridad de varios solventes relevantes al presente trabajo.

<b>Solvente</b>	<b><i>P'</i></b>
Heptano	0.1
Hexano	0.1
Ciclohexano	0.2
Tolueno	2.4
THF	4.0
Dioxano	4.8
Metanol	5.1
Acetonitrilo	5.8
Agua	10.2

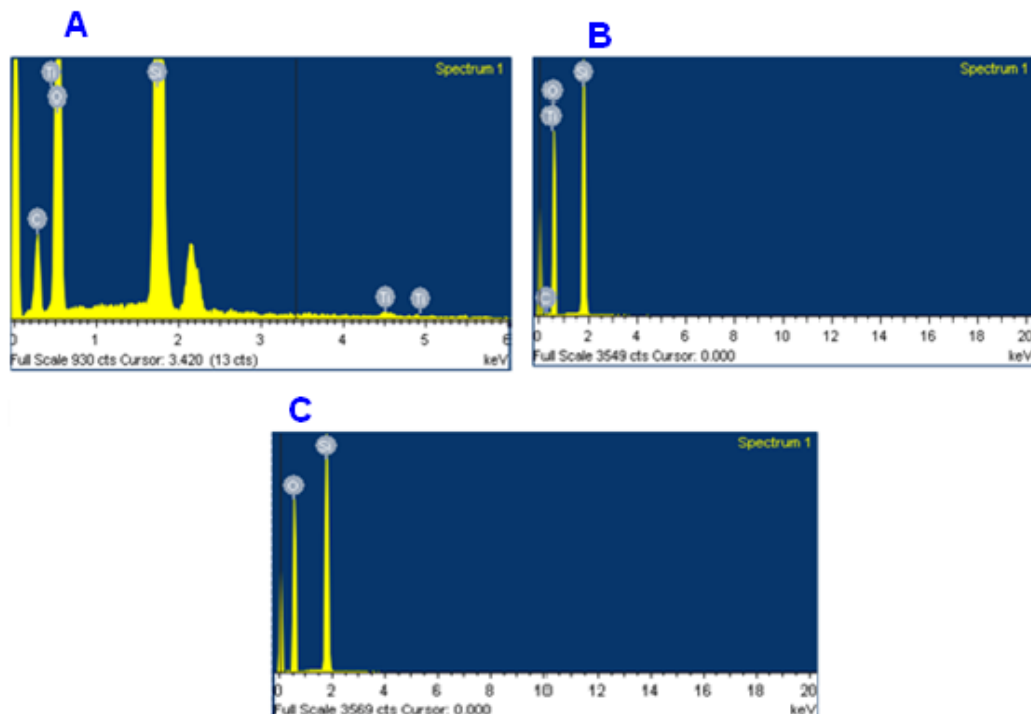
#### 4.2.1. CARACTERIZACIÓN DE TiO<sub>2</sub> SOBRE SÍLICA PARTICULADA

Debido a su gran área superficial, se usó sílica particulada para estudios espectroscópicos. Se empleó la técnica de infrarrojo *DRIFT* (*Diffuse Reflectance Infrared Fourier Transform Spectroscopy*) con los resultados que se muestran en la Figura 7. Se incluyó el sustrato de sílica nativa (no modificada) con propósitos comparativos. En la literatura [20] se reportan para estos espectros, vibraciones de tensión asimétricas con hombro en el rango de 1000-1300 cm<sup>-1</sup> atribuidos a Si–O–Si, característica de unidades SiO<sub>4</sub>; un pico entre 3500-4000 cm<sup>-1</sup> asociado a silanoles aislados (Si–OH); y dos picos, uno alrededor de 800 cm<sup>-1</sup> y otro a 950 cm<sup>-1</sup> que corresponde a vibraciones simétricas de Si–O–Ti. Aunque en la Figura 7 no hay diferencias dramáticas entre los espectros ilustrados, en la región de 900 a 950 se observa un ligero pico que no aparece en la sílica nativa pero sí en las dos titanizadas, lo que



**Figura 7.** Espectros DRIFT de la sílica nativa y la sílica modificada con los dos métodos de titanización.

sugiere que este cambio sea debido al titanio incorporado en la sílica. También se observa una disminución notable en el pico que se encuentra alrededor de  $3750\text{ cm}^{-1}$  que corresponde a bandas de estiramiento O–H de silanoles aislados. Este efecto es un poco más notorio en la sílica titanizada por el método en condiciones anhidras. Esta disminución de la intensidad de este pico se debe probablemente a la formación de enlaces tipo siloxanos con titanio (Si-O-Ti). Estas apreciaciones indican que IR por sí sola no proporciona evidencia totalmente convincente de la presencia de  $\text{TiO}_2$  sobre la sílica. La EDS es una técnica de análisis elemental que se encuentra disponible en el campus de nuestra universidad, y fue empleada para analizar *wafers* y sílica particulada. Aunque esta técnica es, en el mejor de los casos, semicuantitativa (la detección de un elemento varía considerablemente con la masa del mismo), su disponibilidad favorece su utilización para confirmar la titanización de la sílica. La Figura 8 muestra los tres espectros obtenidos de *wafers* modificados con titanio incorporado por los dos métodos estudiados y



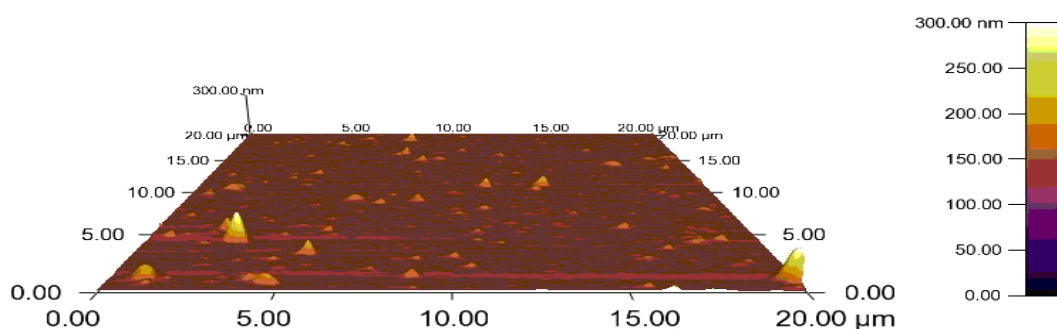
**Figura 8.** Espectros de EDS sobre *wafers*. A) Modificado con titanio por el método sol-gel. B) Modificado con titanio bajo condiciones anhidras. C) *Wafer* nativo.

un tercer espectro de un *wafer* no modificado. Los porcentajes atómicos o molares (promedio de dos mediciones) son: 0.14% de titanio para el producto del método sol-gel y 0.02% de titanio el producto en condiciones anhidras. Estos resultados sugieren que el titanio fue incorporado efectivamente a la superficie de la sílica. Los resultados en la sílica particulada muestran un incremento significativo de estos porcentajes, 3.54% para la sílica titanizada en condiciones anhidras y 2.7% en titanio para la titanización por sol-gel. De nuevo, estos resultados son consistentes con aquellos sobre *wafers*.

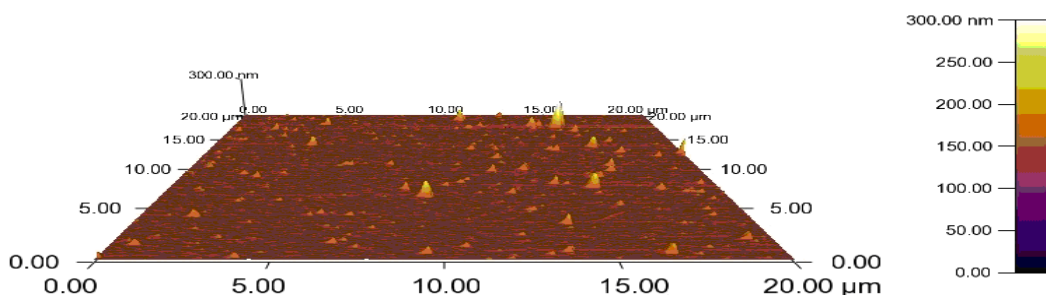
#### **4.2.2. TOPOGRAFIA DE SUSTRATOS DE SÍLICA MODIFICADOS CON $\text{TiO}_2$**

Experimentos preliminares de ángulos de contacto en *wafers* titanizados revelan un gran cambio en el ángulo de contacto de una gota de agua, pasando de  $37.5^\circ$  para un *wafer* no modificado a ángulos demasiado pequeños para ser medibles para *wafers* modificados con titanio. Esta primera observación llevó a realizar un estudio más detallado de la superficie, para conocer “de cerca” que tan homogéneo es el recubrimiento. Este análisis topográfico de la superficie se realizó mediante SEM y AFM.

La Figura 9 muestra la imagen AFM de un área de  $20 \times 20 \mu\text{m}^2$  para la sílica titanizada por el método sol-gel, con una rugosidad promedio ( $n=3$ ) de 1.55 nm. La Figura 10 muestra una imagen similar de la superficie de la sílica titanizada en condiciones anhidras, con una rugosidad de 1.14 nm. Debido a que las condiciones anhidras confinan la reacción a la superficie (el único lugar donde hay grupos silanoles con los cuales el tetra-alcóxido de titanio puede reaccionar), se espera que la superficie de la sílica titanizada en estas condiciones sea una capa homogénea, esencialmente, una monocapa [26]. Aunque la rugosidad es menor, la superficie de la Figura 9 no es tan homogénea como se esperaba y se observan grumos sobre ella, aunque en menor extensión que el producto de la titanización por el método sol-gel.

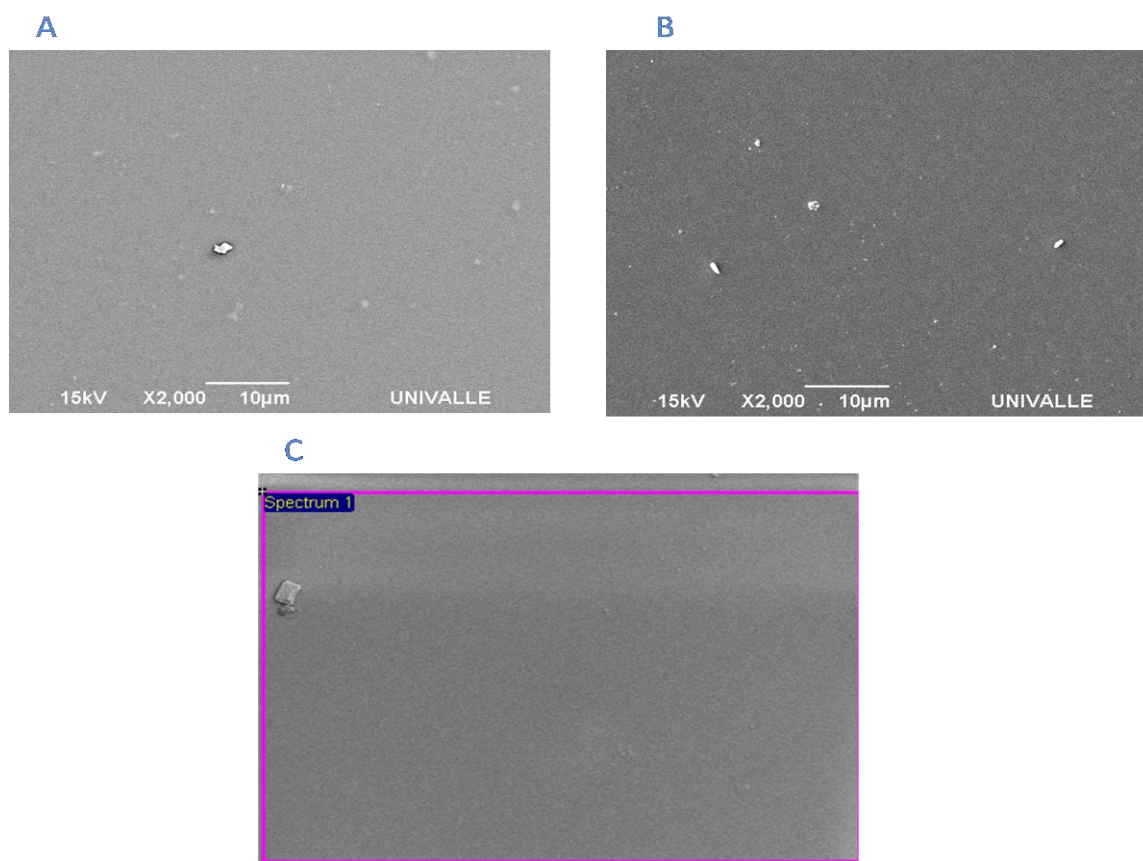


**Figura 9.** Imagen AFM ( $20 \times 20 \mu\text{m}^2$ ) de sílica titanizada por el método sol-gel



**Figura 10.** Imagen AFM ( $20 \times 20 \mu\text{m}^2$ ) de sílica titanizada bajo condiciones anhidras

Para ampliar los estudios de topografía de superficie y confirmar lo observado en las imágenes de AFM se tomaron imágenes SEM a los *wafer* modificados con titanio. La Figura 11 muestra imágenes SEM representativas de *scans* tomados en 3 sitios diferentes de los *wafers* modificados con titanio con los dos métodos estudiados. Se incluye también la micrografía de un *wafer* no modificado (esta última presenta un recuadro que hace parte de un análisis de EDS). Esta técnica permite corroborar la existencia de grumos sobre la superficie, en mayor proporción sobre el *wafer* modificado por el método sol-gel. Nótese que el *wafer* no modificado presenta una pequeña “piedra” que bien puede ser polvo acumulado, puesto que la superficie de estos *wafer* nativos es, o debería ser, muy lisa. Aunque el estudio topográfico de *wafers* modificados no permite confirmar la titanización, sí deja ver que la deposición no es

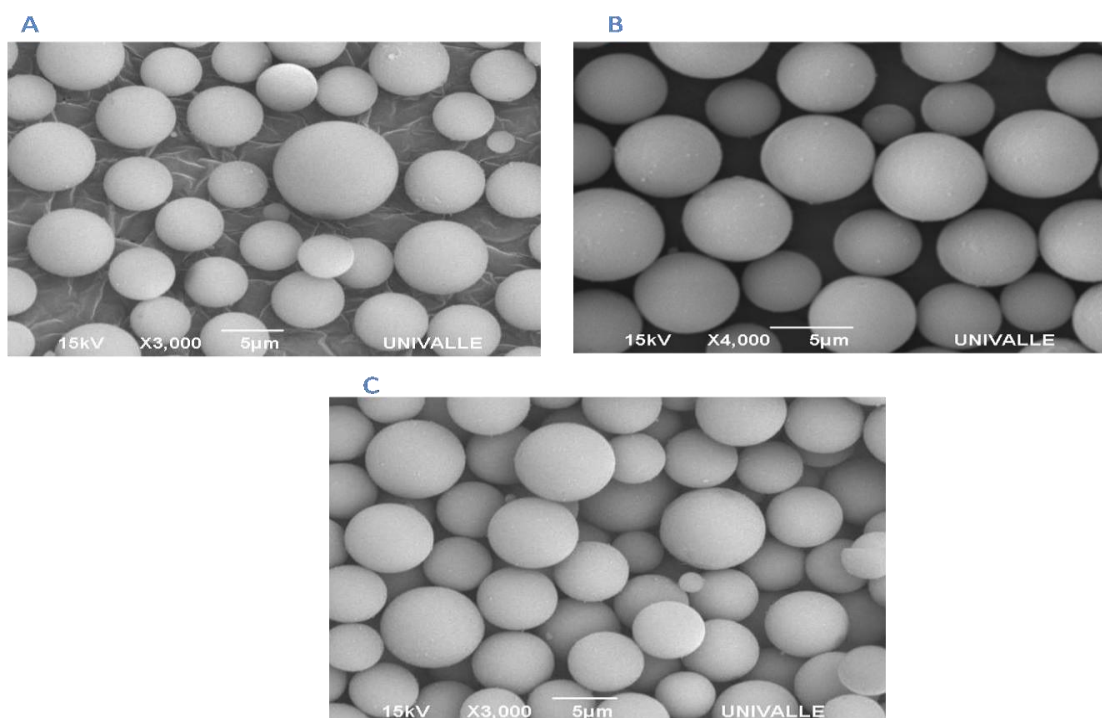


**Figura 11.** Imagen SEM sobre *wafer* ( $10 \times 10 \mu\text{m}^2$ ) A) Modificado con titanio bajo condiciones anhidras. B) Modificado con titanio por sol-gel. C) *Wafer* nativo.

homogénea, probablemente debido a una polimerización vertical del compuesto de titanio.

Para concluir el estudio topográfico es importante considerar las fotografías de SEM tomadas a la sílica particulada. La Figura 12 muestra las imágenes de SEM para sílica particulada modificada con titanio mediante los dos métodos estudiados, e incluye además la micrografía de sílica nativa. Las imágenes de  $5 \times 5 \mu\text{m}^2$  son representativas de al menos 3 micrografías tomadas en diferentes sitios del sustrato. En la Figura 12 no se observan grumos o partículas deformes que podrían ser evidencia de deposición de aglomerados de titanio.

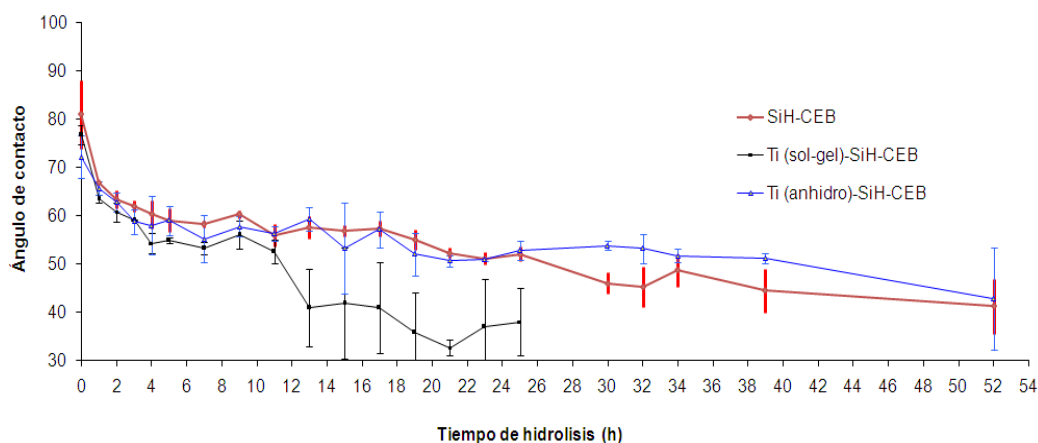




**Figura 12.** Imagen SEM sobre sílica particulada ( $5 \times 5 \mu\text{m}^2$ ) A) Modificada con titanio bajo condiciones anhidras. B) Modificada con titanio por sol-gel. C) Sílica particulada nativa.

#### 4.3. HIDRÓLISIS ALCALINA

La razón de ser de esta investigación es obtener un recubrimiento hidrolíticamente mejorado en comparación con aquel que no incluye titanización. Una vez titanizados los sustratos de sílica (reacción 4) y anclado el hidruro intermediario sobre esta superficie (reacción 5), la sílica es modificada con CEB (reacción 6), y es este sustrato el que se somete a hidrólisis alcalina por exposición prolongada (“envejecimiento”) a una solución *buffer* de bicarbonato 20 mM a pH 10.3 y a una temperatura de 40°C. Esta solución es muy agresiva con la superficie de sílica (recuérdese que la sílica comienza a disolverse a pH por encima de 8) [33]. La prueba de hidrólisis se llevó a cabo con *wafers* y capilares, midiendo el ángulo de contacto y la movilidad electroosmótica, respectivamente, como función del tiempo de exposición al *buffer* alcalino.

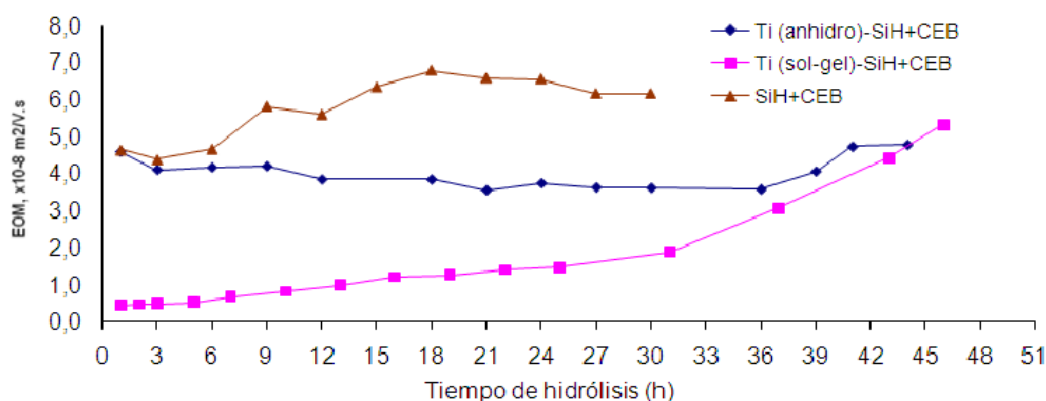


**Figura 13.** Prueba de hidrólisis en *wafers*, ángulo de contacto vs. tiempo de exposición a *buffer* 20 mM de bicarbonato pH 10.3 a 40°C. Las barras de error corresponden a  $\pm$  una desviación estándar (n=3)

La Figura 13 muestra la variación del ángulo de contacto a medida que el *buffer* de carbonato deteriora la superficie de los *wafers* hidrolizando la fase anclada al mismo. Puesto que el sustrato modificado con grupos cloruro de etil bencilo, CEB (ver reacción 6) es hidrofóbico, a medida que la fase se hidroliza pierde estos grupos, su hidrofobicidad disminuye y así mismo el ángulo de contacto de la gota de agua. En esta figura se comparan tres sustratos, dos *wafers* modificados con titanio (uno por cada método de titanización) y uno no modificado con titanio. Cabe resaltar que ambas reacciones, la hidruración y la posterior hidrosililación, se realizaron sobre secciones adyacentes de la misma placa original (de 76.2 mm x 25.4 mm x 1 mm), y se usaron las mismas soluciones reaccionantes para los tres *wafers*, por lo cual la única variación de la superficie se encontraba en la modificación con titanio y, por supuesto, el efecto de este sobre las modificaciones posteriores.

Es evidente cómo disminuye drásticamente el ángulo de contacto de todos los *wafers* después de la primera hora de hidrólisis. Esto se entiende fácilmente puesto que los grupos SiH que no reaccionaron en la hidrosililación (reacción 5) son inestables frente a soluciones acuosas [29], y más aún si estas tienen un pH alto como es el caso aquí. Más importante, el *wafer* titanizado mediante el nuevo método exhibe una caída drástica en su ángulo de contacto después de

diez horas de exposición, mientras que para los otros dos (bajo las mismas condiciones de envejecimiento) el deterioro es significativamente menor. Este “colapso” de la fase va acompañado con un deterioro similar en la incertidumbre de la medición, como se evidencia en las “barras de error” de la curva. Esto último es debido a que la gota está muy aplastada y no tiene una forma homogénea, por lo que la medición del ángulo con la superficie es más errática. A este respecto, se debe tener en cuenta que el procedimiento de hidrólisis en *wafers* requiere de mucha manipulación de los mismos, debido a numerosos enjuagues, manipulación con pinzas, secado, etc. Obsérvese también que los otros dos *wafers* también se deterioran aunque con menor rapidez. Más aún, se observa que durante las primeras 25 horas, el sustrato sin titanizar exhibe una resistencia a hidrólisis que es comparable con aquella del *wafer* titanizado bajo condiciones anhidras. Esto habla favorablemente del enlace Si-C del esquema sintético utilizado. Por otra parte, los resultados de esta prueba disminuyen las expectativas sobre el nuevo método sol-gel, sugiriendo que la titanización no fue del todo efectiva en este caso. Es conveniente, entonces, confirmar estos resultados con una prueba de hidrólisis similar sobre capilares, como se muestra en la Figura 14.



**Figura 14.** Prueba de hidrólisis en capilares, EOM  $\times 10^{-8} \text{ m}^2/\text{V.s}$  vs. tiempo de exposición a *buffer* 20 mM de bicarbonato pH 10.3 a 40°C, bajo 100 psi de presión de aire. Las mediciones de EOM se hicieron a 30°C en *buffer* 20 mM MOPS a pH 7.0. En todos los casos, las barras de error ( $n=3$ ) no se muestran por ser más pequeñas que el símbolo utilizado.

De esta gráfica se puede extraer información importante y más confiable, puesto que los capilares no están sujetos a manipulación como en el caso de los *wafers*. En primer lugar, se confirma la estabilidad superior del producto de titanización en condiciones anhidras. De manera similar, el producto de la titanización con el nuevo método sol-gel es el que exhibe mayor susceptibilidad a hidrólisis. Este producto se deteriora lentamente durante las primeras 30 horas, después de lo cual acelera su decadencia. Por otro lado, la baja EOM inicial del capilar modificado por sol-gel se debe probablemente a la rugosidad que este exhibe después de la titanización. Este fenómeno de disminución de la EOM en sustratos rugosos ya había sido reportado por Gómez y Sandoval en 2010 [29]. Adicionalmente, y en consistencia con el experimento ilustrado en la Figura 13, se observa que el sustrato sin titanizar exhibe una resistencia a hidrólisis que es inferior a aquella del *wafer* titanizado bajo condiciones anhidras, pero mejor que la del producto del proceso sol-gel.

## 5. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

En el presente trabajo se desarrollaron dos métodos de incorporación de óxido de titanio sobre la superficie de sustratos de sílica, uno de los cuales fue un desarrollo propio siguiendo la metodología sol-gel. Pude inferirse a partir de la evidencia DRIFT y SEM, que el óxido de titanio se fijó químicamente al sustrato de sílica.

Se confirma una mejora en la estabilidad hidrolítica de la fase orgánica enlazada al capilar titanizado en condiciones anhidras. Esta resistencia es menor para el no titanizado y aún menor para el capilar titanizado por el nuevo método sol-gel. Esto se debe probablemente a una deficiente titanización en este último caso.

Aunque se observa un incremento en la estabilidad hidrolítica para uno de los sustratos titanizados, no se tiene una plena certeza de la morfología de la superficie modificada ya que, la naturaleza de las técnicas de microscopías AFM y SEM, no permiten asegurar la formación de monocapas homogéneas sobre la superficie de sílica.

Uno de los pasos a seguir en posteriores trabajos es el optimizar la composición de la mezcla de solventes utilizada para la dilución de hidrolizato, a fin de obtener unos recubrimientos más homogéneos, idealmente en forma de monocapas en el nuevo método.

## 5. BIBLIOGRAFÍA

1. Kuhn, R.; Hoffstetter, K. S. *Capillary electrophoresis: Principles and practice*. Springer verlag. Germany, **1993**.
2. Altria, K. D.; Rogan, M. M. *Pharmaceutical Analysis*. Division Glaxo Research and Development Park Road. England. **2000**. *Introduction to quantitative applications of capillary electrophoresis in pharmaceutical analysis*
3. Copper, C. I.; Whitaker, K. W. *J. Chem. Educ.* **1998**, 75, 347-351. *Capillary Electrophoresis: Part II. Applications*
4. Copper, C. I. Capillary Electrophoresis Background. *J. Chem. Educ.* **1998**, 343-347. *Part I. Theoretical and Experimental*
5. Bard, A. J.; Faulker, L. R. Wiley sons. New York **1980**. *Electrochemical methods: Fundamentals and applications*.
6. Sandoval, J. E.; Chen, S. M. *Anal. Chem.* **1996**, 68, 2771-2775. *Method for the accelerated measurement of electroosmosis in chemically modified tubes for capillary electrophoresis*.
7. Huang, M.; Schneiderman, D.; Novotny, M.; Fatunmbi, H.; Wirth, M. J. *Microcol. Sep.* **1994**, 6, 571-576. *Self-assembled alkylsilane monolayers for the preparation of stable and efficient coatings in capillary electrophoresis*.
8. Montes, M. C.; Van Amen, C. V.; Pesek, J. J.; Sandoval. J. E. *J. Chromatogr.* **1994**, 688, 31-45. *Chromatographic evaluation of alkyl-bonded phases prepared through olefin hydrosilylation on a hydride-silica intermediate*.

9. Chiari, M.; Nesi, M.; Sandoval, J. E.; Pesek, J. J. *J. Chromatogr. A.* **1995**, 717, 1–13. *Capillary electrophoretic separation of proteins using stable, hydrophilic poly(acryloylamino ethoxyethanol)-coated columns.*
  
10. Silva, R.C.; Airoidi, C.; Collins, K. E; Collins, H. C. *J. Chromatogr. A.* **2005**, 1073, 155–162. *Titanized silicas modified by C18, as promising stationary phases for high performance separations.*
  
11. Huang, X.; Doneski, L. J.; Wirth, M. J. *Anal. Chem.* **1998**, 70, 4023-4029. *Surface-confined living radical polymerization for coatings in capillary electrophoresis.*
  
12. Kirkland, J. J.; Adams, J. B.; van Straten, M. A.; Claessens, H.A. *Anal. Chem.* **1998**, 4344-4352. *Bidentate silane stationary phases for reversed-phase high-performance liquid chromatography.*
  
13. Sandoval, J. E.; Pesek, J. J. *Anal. Chem. A.* **1991**, 63, 2634-2641. *Hydrolytically stable bonded chromatographic phases prepared through hydrosilation of olefins on hydridemodified silica intermediate.*
  
14. Kessel, C. R.; Granick, S. *Langmuir* **1991**, 7, 532-538. *Formation and characterization of a highly ordered and well-anchored alkylsilane monolayer on mica by self-assembly.*
  
15. Zheng, S.K.; Wang, T.M.; Xiang, G.; Wang, C. *Vacuum.* **2001**, 61, 361–366. *Photocatalytic activity of nanostructured TiO<sub>2</sub> thin films prepared by dc magnetron sputtering method.*
  
16. Radecka, M.; Zakrzewska, M.; Czternastek, H.; Stapiński, T.; Debrus, S. *Appl. Surf. Sci.* **1993**, 65, 227–234. *The influence of thermal annealing on the structural, electrical and optical properties of TiO<sub>2-x</sub> thin films.*
  
17. Hou, Y. Q.; Zhuang, D. M.; Zhang, G.; Zhao, M.; Wu, M. S. *Appl. Surf. Sci.* **2003**, 218, 97–105. *Influence of annealing temperature on the properties of titanium oxide thin film.*

18. Lopez, T.; Navarrete, J.; Gomez, R.; Novaro, O.; Figueras, F.; Armendariz, H. *Appl. Catal. A: General*. **1995**, 125, 217-232. *Preparation of sol-gel sulfated ZrO<sub>2</sub>-SiO<sub>2</sub> and characterization of its surface acidity.*
19. Tani, K.; Suzuki, Y. *J. Chromatogr.* **1996**, 722, 129-134. *Influence of titania matrix on retention behavior in reversed-phase liquid chromatography.*
20. Gozolino, M.; Serio, M.; Tesser, R.; Santacesaria, E. *Appl. Catal.* **2007**, *Grafting of titanium alkoxides on high-surface SiO<sub>2</sub> support: and advanced technique for the preparation of nanostructured TiO<sub>2</sub>/SiO<sub>2</sub> catalysts.* 325, 256-262.
21. Tani, K.; Suzuki, Y. *J. Chromatogr. A*. **1996**, 772, 129–134. *Influence of titania matrix on retention behaviour in reversed-phase liquid chromatography.*
22. Murayama, K.; Nakamura, H.; Nakajima, T.; Takahashi, K.; Yoshida, A. *Microchem. Journal*. **1994**, 49, 362-367. *Preparation and evaluation of octadecyl titania as column-packing material for high-performance liquid chromatography.*
23. Pesek, J.J.; Matyska, M.T.; Ramakrishnan, J. *J. Chromatogr.* **1997**, 44, 538–544. *Synthesis and characterization of titania based stationary phases using the silanization/hydrosilation method*
24. Fonseca, D.; Collins, K.; Collins, C. *J. Chromatogr. A* **2004**, 1030, 209-215. *Titanized sílica-based stationary phases prepared with thermally and microwave-immobilized poly(methyloctylsiloxane).*
25. Fujimoto, C. *Electrophoresis* **2002**, 23, 2929–2937. *Titanium dioxide coated surfaces for capillary electrophoresis and capillary electrochromatography.*
26. Silva, R.C.; Airoidi, C.; Collins, K. E; Collins, H. C. *J. Chromatogr. A*. **2006**, 1114, 45–52. *Influence of the TiO<sub>2</sub> content on the*



*chromatographic performance and high pH stability of C18 titanized phases.*

27. Gómez, J. E.; Sandoval, J. E. *Electrophoresis* **2008**, 29, 381–392. *The effect of conditioning of fused-silica capillaries on their electrophoretic performance*
28. Zhuravlev, L. T. *Colloids Surf. A.* **2000**, 173, 1-38. *The surface chemistry of amorphous silica. Zhuravlev model L.T. Zhuravlev*
29. Gomez, J. E.; Sandoval, J. E. *Anal. Chem.* **2010**, 82, 7444-7451. *New Approaches to prepare hydride silica.*
30. Sandoval, J. E.; Chen, S. M. *Anal. Chem.* **1996**, 68, 2771-2775. *Method for the accelerated measurement of electroosmosis in chemically modified tubes for capillary electrophoresis.*
31. Hua, Zi-Le.; Shi, J.L.; Zhang, W.H.; Huang, W.M. *Materials Lett.* **2002**, 53, 299-304. *Direct synthesis and characterization of Ti-containing mesoporous.*
32. Snyder, L. R. *J. Chromatogr.* **1974**, 92, 223-230. *Classification of the solvent properties of common liquids.*
33. Kirkland, J.J.; Van-Straten, M.A.; Claessens, H.A. *J. Chromatogr.* **1995**, 691, 3-19. *High pH mobile phase effects on silica-based reversed-phase high-performance liquid chromatographic columns.*